View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Tsukuba Repository

Relevance between functions and intracellular localization of RNA helicase A

著者	藤田 英俊
内容記述	Thesis (Ph. D.)--University of Tsukuba, (A), no. 3761, 2005.3.25 Includes bibliographical references
発行年	2005
URL	http://hdl.handle.net/2241/1968

【214】

氏　名（本籍）	藤　田　英　俊（京 都 府） （ふじ　た　ひで　とし）
学 位 の 種 類	博　　士（学　　術）
学 位 記 番 号	博　甲　第　3761　号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	生命環境科学研究科
学 位 論 文 題 目	**Relevance Between Functions and Intracellular Localization of RNA Helicase A** （RNA ヘリケース A の機能と細胞内局在との相関関係の解析）

主　査	筑波大学教授	農学博士	深　水　昭　吉
副　査	筑波大学教授	農学博士	小　林　達　彦
副　査	筑波大学教授	農学博士	馬　場　　忠
副　査	筑波大学客員教授	医学博士	石　田　直理雄

論 文 の 内 容 の 要 旨

RNA ヘリケース A（RHA）はホロ RNA ポリメラーゼ Ⅱ（Pol Ⅱ）複合体の構成因子であり，かつ，ATPase ／ヘリケースでもある。RHA は転写段階にて，転写コアクチベータ CREB-binding protein（CBP）と Pol Ⅱとの結合を仲介し，その転写を活性化する。また，RHA は種々の因子（転写因子，DNA，RNA）と結合し，その転写を活性化することが知られている。一方で，RHA は RNA 結合タンパク質であり，転写後の splicing，RNA export においても機能することが報告されている。RHA は，nuclear localization signal（NLS）と nuclear export signal（NES）を有し，核と細胞質をダイナミックに移動する shuttle protein としても知られている。以上の報告より，RHA の遺伝子発現における多機能の発揮には，種々の因子との結合を介する側面と，核と細胞質をシャトルするという側面が必要であると考えられる。本研究では，RHA のさらなる遺伝子発現機構を解明することを目的とし，1. RHA と結合する細胞内因子の探索と同定，および，その機能解析，2. RHA の機能と細胞内局在の相関関係の解析を行なった。

1. RHA を bait として Yeast two-hybrid screening を行なった結果，Methyl-CpG Binding Domain protein 2（MBD2）を得た。MBD2 には MBD2a，MBD2b の二つのアイソフォームが存在し，メチル化された DNA に結合して転写を抑制する転写抑制因子として知られている。結合実験の結果，RHA は MBD2a と特異的に結合した。RHA が活性化する CREB 依存的な転写において，DNA がメチル化されている場合，MBD2a はその転写を抑制し，一方で，DNA がメチル化されていない場合，MBD2a はその転写を活性化した。さらに，MBD2a/RHA は協調的に CREB の転写を活性化することを示した。また，*in vivo* 結合実験の結果，RHA/MBD2a 複合体は，転写コリプッレサーである Histone deacetylase 1 とは結合していない結果を得た。さらに，RHA/MBD2a がクロマチン化された CREB target 遺伝子を活性化し，かつ，そのプロモーター上にリクルートされることを明らかとした。これらの結果は，MBD2a はメチル化された DNA からの転写を抑制するのみならず，転写活性化複合体とも相互作用して転写を活性化する，すなわち，遺伝子発現における MBD2a の相反する機能が示唆された。

2. RHA は Pol Ⅱとの結合と ATPase 活性を独立に用いて転写を活性化する転写活性化因子であり，かつ，splicing などの RNA metabolism に機能する RNA 結合タンパク質でもある。転写活性化および RNA 結合に関する種々の変異体を，Green fluorescence protein（GFP）融合タンパク質として細胞内に発現させてその局在を解析した。RHA の転写活性化能に関する種々の変異体の細胞内局在を解析した結果，野生型の RHA は核に局在化するのに対し，転写活性化能が減少するにつれて，RHA の細胞質への局在化が認められた。さらに，Pol Ⅱとの結合が欠失した変異体では細胞質への局在化が認められ，逆に，Pol Ⅱ結合領域のみでは核への集積が認められた。これらの結果から，Pol Ⅱとの結合が RHA の核への局在化の一部を担っていることが示唆された。一方で，RHA の RNA 結合領域はその多くが細胞質への局在化を示し，SV40 T-antigen の NLS を付加しても積極的に細胞質へと集積した。興味深いことに，RNA と結合できない変異体は核へと局在を変えた。これらの結果から，RHA の RNA 結合能は細胞質への局在化に関与していることが示唆された。以上の結果より，RHA は NLS，NES のみならず，Pol Ⅱとの結合，および，RNA との結合によってもその細胞内局在が制御されていると考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

RNA ヘリケース A（RHA）は，転写，スプライシング，RNA の輸送など遺伝子発現の各段階において重要な役割を担っている。RHA は核と細胞質を行き来するという細胞内局在の変化と種々の因子との結合という二つの性質を介して多機能を発揮していると考えられている。すでに多くの結合因子が得られているが，RHA の多機能を考えるとまだ未同定の結合因子の存在が示唆されていた。さらに，核内外への輸送機構は明らかになりつつあるが，その詳細については不明な点が多く残されている。

本研究では，RHA の機能についての解析を試みている。その結果，RHA と結合する新規細胞内因子である MBD2 を同定し，転写抑制因子 MBD2a が RHA との結合を介して転写活性化に機能することを明らかとした。特に，RHA/MBD2a 複合体が DNA のメチル化を介して転写の On/Off を制御するモデルを提唱し，転写制御機構に関して新しい境地を築いている。

RHA と結合する新規因子の同定と機能解析，および，RHA の細胞内局在の制御ドメインの同定した点は十分に評価できるが，機能と細胞内局在の相互作用について詳細な結論を得るまでには至っておらず，今後に残された課題も少なからずある。しかし，研究自体は非常に注意深く行われており，十分な信頼性を有しており，当該研究分野の発展に貢献したと判断できる。

よって，著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。